

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

CAMPUS BAIXADA SANTISTA

CAIO MARINS TOMÁS

**AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO TUMOR
PULMONAR EXPERIMENTAL INDUZIDO
POR URETANA EM CAMUNDONGOS
SEDENTÁRIOS**

Santos
2012

CAIO MARINS TOMÁS

AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO TUMOR PULMONAR EXPERIMENTAL INDUZIDO POR URETANA EM CAMUNDONGOS SEDENTÁRIOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de São
Paulo - Campus Baixada Santista - como
parte dos requisitos curriculares para a
obtenção do título de bacharel em Educação
Física – Modalidade Saúde.

Orientador(a): Profa. Dra. Valquiria Bueno

Santos

2012

CAIO MARINS TOMÁS

**AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO TUMOR
PULMONAR EXPERIMENTAL INDUZIDO
POR URETANA EM CAMUNDONGOS
SEDENTÁRIOS**

Este exemplar corresponde à redação
final do Trabalho de Conclusão de
Curso defendido por Caio Marins
Tomás e aprovado pela Banca
Examinadora em 18 / 02 / 2013.

Prof. Dra. Valquiria Bueno

Orientador

Santos
2013

Banca examinadora

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior

Presidente da Banca

Prof. Dra. Camila Aparecida Machado de Oliveira



Prof. Dr. Ricardo José Gomes

DEDICATÓRIA:

Dedico esse trabalho a meus familiares e amigos, em especial, aos meus pais. Também dedico esse trabalho a todas as pessoas que perderam entes queridos para câncer.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço à minha professora orientadora Valquiria Bueno pelo apoio acadêmico e paciência em todas as fases de pesquisa;

Agradeço a minha família por todo amor, carinho, suporte e compreensão durante todos esses anos de faculdade;

Agradeço aos amigos que estiveram do meu lado em todos os momentos, dando força e me ajudando a continuar seguindo em frente;

Agradeço a Mariana Pereira Simonato pelo companheirismo e apoio em todos os momentos ao longo do curso;

Agradeço aos professores da banca por sua disponibilidade e empenho. Suas contribuições serão ricas para o estudo;

Agradeço aos colegas e professores da faculdade por os melhores anos de minha vida;

Agradeço ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (Disciplina de Imunologia), em especial, a Profa. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri e seus orientandos por todo suporte e paciência durante a fase de experimentação da pesquisa;

Agradeço a todos os funcionários da Universidade Federal de São Paulo – Campus Baixada Santista e São Paulo, em especial, o técnico de laboratório (biotério) Gel Pereira por todo suporte durante a fase de experimentação da pesquisa;

Agradeço a todos os que contribuíram diretamente ou indiretamente com esse trabalho;

Por fim, agradeço a Deus por tudo o que fez durante todos esses anos, sempre me inspirando a seguir por caminhos certos e me dando força em todos momentos que pensava em desistir.

EPÍGRAFE:

“The Victor”

If you think you are beaten, you are.
If you think you dare not, you don't.
If you like to win but think you can't,
It's almost a cinch you won't.
If you think you'll lose, you're lost.
For out in the world we find
Success begins with a fellow's will.
It's all in the state of mind.
If you think you are out classed, you are.
You've got to think high to rise.
You've got to be sure of your-self before
You can ever win the prize.
Life's battles don't always go
To the stronger or faster man.
But sooner or later, the man who wins
Is the man who thinks he can

C.W. Longenecker

Resumo:

Tumores “escapam” da função antitumoral pela secreção de fatores que inibem o sistema imune. Um efeito dos fatores secretados pelo tumor é o aumento das células mielóides supressoras (MDSC) que suprimem a resposta imune favorecendo assim o desenvolvimento tumoral. Buscando compreender a ação do câncer sobre as células do sistema imune, nosso grupo avaliou as mudanças quantitativas das células da resposta imune (linfócitos e mielóides supressoras) em camundongos BALB/c sedentários com câncer de pulmão induzido por um carcinógeno químico. Os camundongos foram induzidos ao câncer de pulmão pela administração de Uretana (120 dias para formação de nódulos pulmonares) e após o desenvolvimento tumoral o baço, timo, medula óssea, e o sangue foram coletados e avaliados por citometria de fluxo (T CD4, T CD8, além das MDSC - CD11b⁺Gr-1⁺). Os pulmões foram removidos para análise histológica (número e área dos nódulos tumorais). Nosso intuito foi comparar camundongos sedentários saudáveis e sedentários com câncer de pulmão induzido por Uretana quanto à quantidade de linfócitos e células mielóides supressoras em alguns órgãos linfóides (timo, medula óssea, baço) e sangue. Também avaliamos, se o possível aumento de células mielóides supressoras esteve relacionado ao aumento da área e número de nódulos pulmonares. Os resultados contribuirão para o melhor entendimento do câncer de pulmão e sua relação com a expressão de MDSC em camundongos BALB/c sedentários. Na sequência é meu interesse propor modalidades de exercício físico que possam agir sobre as células do sistema imune como terapia de restrição do desenvolvimento tumoral.

Palavras-Chaves: Uretana, câncer de pulmão, linfócitos, células mielóides supressoras, citometria de fluxo, órgãos linfóides.

Abstract:

Tumors "escape" from the antitumor function by secreting factors that inhibit the immune system. Factors secreted by tumors affect the immune system by inducing the increase of myeloid derived suppressor cells (MDSC) which suppress the immune response and thus promote tumor development. In order to further understand how cancer acts on immune system cells, we assessed the quantitative changes of immune response cells (lymphocytes and myeloid suppressor) in sedentary BALB/c mice with lung cancer induced by a chemical carcinogen (Urethane). Mice were injected with Urethane with the aim to induce lung cancer (120 days for lung nodule formation) and after the tumor development the spleen, thymus, bone marrow and the blood were collected and assessed by flow cytometry (T CD4, T CD8, besides of MDSC -CD11b+ Gr-1+). Lungs were removed to histological analysis (number and area of neoplastic nodules). Our aim was to quantify lymphocytes and myeloid suppressor cells in some lymphoid organs (thymus, bone marrow, spleen) and blood from sedentary healthy mice and sedentary urethane-induced lung cancer. We also evaluated whether a possible increase of myeloid suppressor cells was related to the increase in area and number of lung nodules. The results will contribute to the better understanding of lung cancer and its relationship with the expression of MDSC in sedentary BALB/c mice. Our future interest is to propose methods of exercise that may act on the immune system cells as therapy of tumour development constraint.

Key-words: Urethane, lung cancer, lymphocytes, myeloid suppressor cells, flow cytometry, lymphoid organs

SUMÁRIO:

INTRODUÇÃO.....	11
1 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2 – RESULTADOS.....	21
3 – DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS.....	37

INTRODUÇÃO

O Câncer é um termo genérico utilizado para denominar diversos tipos de doenças que podem acontecer em todas as células de nosso corpo. Também chamado de neoplasias ou tumores malignos, o câncer tem liderado as causas de morte no mundo. Em 2008, 7,6 milhões de pessoas morreram de problemas derivados do câncer. Os cânceres de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama, são os que mais causam morte (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Os tumores malignos (cânceres) têm crescimento celular descontrolado, sofrem metástase e invadem outros tecidos através da circulação, proliferando pelo corpo e originando novos sítios cancerígenos (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1995). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), as neoplasias se manifestam começando por apenas uma célula. A transformação de uma célula sadia para um tumor é entendido como um processo de hiperplasia, ou seja, um aumento do número de células. Essa transformação sofre mudanças de estágios, desde lesões pré-cancerígenas até desenvolvimento de tumores malignos sendo que o tempo de transformação varia de um tipo de câncer para outro.

O entendimento de como se dá o desenvolvimento do câncer e as abordagens em saúde frente a tal doença podem levar a melhor evolução dos pacientes. No Brasil o câncer de pulmão foi responsável por 21.069 mortes em 2009, sendo 13.293 homens e 7.776 mulheres. A sobrevida média cumulativa total em cinco anos é de 13 a 21% em países desenvolvidos e de 7 a 10% nos países em desenvolvimento, estima-se 27.239 novos casos em 2012 (17.210 homens e 10.110 mulheres) segundo dados do INCA (2012). Em 2012 está previsto que 577.190 pessoas vão morrer de câncer nos EUA (SIEGEL, NAISHADHAM e JEMAL, 2012).

As neoplasias também estão relacionadas a hábitos como o uso de tabaco, álcool, drogas e dieta não saudável (KHAN, AFAQ e MUKHTAR, 2009). O câncer de pulmão na maioria dos casos é relacionado ao uso de tabaco, mas também há evidências que fatores genéticos e da dieta podem desempenhar um papel, e a exposição ao asbesto e possivelmente outras substâncias inaladas podem ter um efeito sinergista junto ao fumo (FORBES e JACKSON, 1998).

Os tumores humanos podem ser reproduzidos em modelos experimentais, já que ambos apresentam características similares. Vários autores têm utilizado modelos

animais para o estudo do câncer (TOH *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2011; ROSIN *et al.*, 2011; ROSIN *et al.*, 2011 apud MALKINSON, 1998), onde salientamos o câncer de pulmão induzido por Uretana que causa alterações gênicas similares às aquelas observadas em adenocarcinomas pulmonares de humanos (ROSIN *et al.*, 2011 apud MALKINSON, 1998).

A Uretana é classificada como um composto químico mutagênico e como um carcinogênico, levando a formação de tumores malignos, exemplo: adenomas pulmonares (WASHINGTON STATE UNIVERSITY, 2005).

Durante o desenvolvimento tumoral, a resposta imune efetora tem um papel importante e como demonstrado por Rosin *et al.* (2011) ocorre a produção de IFN- γ pelos linfócitos do baço em taxa aumentada (em relação aos animais controle) até 20 dias após a indução tumoral por Uretana quando os nódulos tumorais ainda nem se formaram. A produção de IFN- γ , provavelmente pelas células T, ocorre após tais células terem identificado o antígeno (carcinógeno). A função do IFN- γ é principalmente ativar os fagócitos e células *natural killer* (NK), aumentar a expressão das moléculas da classe I do *Major Histocompatibility Complex* (MHC), promover diferenciação dos linfócitos T e B e ainda ativar células endoteliais vasculares, promovendo a adesão dos linfócitos T CD4 e alterações morfológicas que facilitam o extravasamento dos linfócitos (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1995).

Após a injeção de Uretana, Rosin *et al.* (2011) observaram que no baço, pulmões e sangue após 20, 30 e 120 dias ocorreu o aumento da porcentagem de células mielóides supressoras (MDSC) e células T reguladoras (Treg). As MDSC que serão objetivo do presente estudo ocorrem também em pacientes com câncer onde a evolução tumoral se associa ao aumento das mesmas (DIAZ-MONTEIRO *et al.*, 2008; GOULART, PLUHAR e OHLFEST, 2012). Assim, a progressão tumoral parece estar relacionada com o aumento de células supressoras/reguladoras (CD11b⁺Gr-1⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ - T reguladoras) (GOULART, PLUHAR e OHLFEST, 2012; ROSIN *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2011; DIAZ-MONTERO *et al.*, 2008). Tais células suprimem a resposta imune efetora pela secreção de fatores como TGF- β 1 (fator de crescimento e transformação), HGF (fator de crescimento do hepatócito), em conjunto ao EGF (fator de crescimento epidermal) que é secretado pelas células do tumorais. Esses fatores estão ligados a indução do EMT (transição epitélio-mesenquimal) pelas MDSC, levando em última instância a não destruição das células tumorais e acelerando a metástase (TOH *et*

al, 2011). Os achados de Rosin *et al.* (2011) corroboram com outros dados pois aos 30 dias pós injeção de Uretana, a produção de IFN- γ diminui enquanto a porcentagem das MDSC aumenta assim como das células T reguladoras (Treg). Esses dados sugerem que já na fase inicial da indução ao câncer a resposta imune efetora parece ser silenciada pela ação da CD11b⁺Gr-1⁺ (população celular que aumenta em porcentagem na durante o desenvolvimento tumoral).

Diaz-Montero *et al.* (2008) evidenciaram que altos níveis de MDSC no sangue estiveram relacionados a estágios mais avançados (IV) e malignos do câncer em seres humanos. Colaborando com essa informação, Goulart, Pluhar e Ohlfest (2012), evidenciaram que cães que desenvolveram tumores espontâneos apresentavam alteração no número de MDSC. Nesse estudo observou-se que quanto mais agressivo o estágio do câncer (metástase), maior a porcentagem de MDSC no sangue (36,2% mais elevado comparado a estágios iniciais). Os linfócitos T (CD4 e CD8) são influenciados diretamente pelas MDSC e têm sua proliferação inibida. Isso foi confirmado a partir da coleta de MDSC de cães com osteosarcoma, que foram cocultivadas por 72 horas com linfócitos T CD4 e CD8 de cães saudáveis sendo observada a diminuição da proliferação linfocitária.

Com relação ao exercício e função imune, diversos autores afirmam que o exercício físico promove alterações no sistema imune. Segundo Walsh *et al.* (2011) há um consenso sobre o papel do exercício físico (crônico e agudo) na modulação no número e função das células sistema imune inato (neutrófilo, monócito, NK) presentes na corrente sanguínea (WALSH *et al.* 2011). Os autores afirmam que mais estudos são necessários para determinar se as mudanças do exercício (agudo ou crônico) sobre a resposta imune inata favoreceriam ou não a susceptibilidade a infecções.

Quando se trata da resposta imune adquirida, Walsh *et al.* (2011), a intensidade e a duração do exercício podem levar a diminuição das células T, por aumento das catecolaminas e cortisol. Em corroboração a essas informações, Lancaster *et al.* (2004) evidenciaram que indivíduos treinados submetidos a exercício agudo e crônico de alta intensidade sofreram diminuição do linfócito T (CD3⁺IFN- γ ⁺). Porém isso não significa, por si só, uma situação de imunossupressão, pois a produção de citocinas faz parte de um processo que culminará na proliferação e citotoxicidade linfocitária (WALSH *et al.* 2011).

A comparação entre indivíduos sedentários saudáveis e indivíduos treinados em relação à resposta imune não mostra diferenças significativas. Como dito anteriormente, dependendo da intensidade do treino, há maior probabilidade do indivíduo que treina contrair uma infecção de vias aéreas superiores, do que um indivíduo jovem-adulto sedentário saudável. Assim, os efeitos positivos do treinamento na função imune na maioria das vezes podem ser mais evidentes em indivíduos com idade avançada, situações de estresse e outros fatores (WALSH *et al.* 2011).

As ações do exercício físico sobre o desenvolvimento tumoral ainda não se encontram elucidadas (WALSH *et al.* 2011) e pouco se sabe de seu efeito diretamente sobre a resposta imune em tal condição. Meyerhardt *et al.* (2006), buscou compreender a relação da quantidade de atividade física de indivíduos com câncer de colon (estágio III) com os índices de sobrevivência e recorrências. Eles observaram que pacientes que mantinham uma média de atividade física ao redor de 18 – 26,9 horas/semana tinham “menor proporção de doença” (maior sobrevivência e menos recorrências de tumor). Em contribuição, Baltgalvis *et al.* (2009) demonstraram que uma dieta saudável e exercício são fundamentais para prevenir o câncer colorretal experimental. Nesse estudo, o exercício associado à dieta com menos gordura foi mais eficaz em prevenir a formação de pólipos. Em sua dissertação, Cal (2012), demonstrou que em camundongos BALB/c com tumor induzido por Uretana, o exercício físico teve efeito inibitório sobre a progressão e incidência de tumores de pulmão. Os animais foram submetidos a dois tipos de exercício em tanque de água. Um dos grupos realizou treino considerado aeróbio, que consistia em quatro sessões semanais de 20 minutos cada (nado livre). O treinamento com o grupo de exercício anaeróbio consistiu em três sessões semanais de 20 minutos com cargas progressivas de 5% a 20% da massa corporal. O exercício anaeróbio foi intervalado, onde os camundongos praticam 2 minutos de natação com carga e 2 minutos de descanso. O grupo anaeróbio foi o que obteve resultados mais significativos em relação à inibição de aparecimentos e desenvolvimento de nódulos no pulmão. Mesmo que o grupo aeróbio tenha demonstrado diminuição da incidência de tumores, os resultados em relação a esse grupo não foram significativos. Tanto o grupo anaeróbio, quanto o grupo aeróbio foram comparados a um grupo dito “controle” que também tinha o câncer induzido por Uretana. Os mecanismos pelos quais o exercício causou esse benefício não foram avaliados pelo autor da dissertação. Diante disso torna-se relevante o desenvolvimento de estudos complementares sobre os mecanismos de

defesa do organismo, progressão do câncer e exercício. Thomas e Davies (2007) citam que a literatura é rica em publicações sobre exercício físico, alimentação e tratamento de câncer, melhorando alguns aspectos, como: diminuição da fadiga, menor formação de trombos, composição corporal, constipação e bem-estar psicológico. Porém, segundo Walsh *et al.* (2011), a influência positiva do treinamento físico sobre os mecanismos anti-tumorais ainda necessita de elucidação.

Acredita-se que o exercício promove alterações nos mediadores inflamatórios (CRP, proteína C reativa; TNF- α , fator de necrose tumoral, e IL-6). Alguns autores observaram maior resposta imune citotóxica em camundongos que treinaram tanto voluntariamente (roda de corrida) quando induzidos (esteira eletrônica de corrida) em comparação a camundongos sedentários. Todos os animais tiveram desenvolvimento tumoral, e apenas os que estavam engajados em uma terapia de exercício demonstraram menor percentual de células tumorais (MACNEIL e HOFFMAN-GOETZ, 1993). Porém os estudos que relacionam o efeito exercício sobre o sistema imune em modelos de câncer ainda esbarram em problemas, que Walsh *et al.* (2011) citam como futuros direcionamentos para obter maior clareza sobre a ação do exercício na melhora da imunidade antitumoral. Esses são: (a) Quais mediadores inflamatórios e mecanismos antitumorais são mais sensíveis ao exercício? (b) Qual a duração e intensidade do exercício para que se chegue à resposta antitumoral? (c) Qual o período mais adequado em relação à sessão de exercício para a coleta de amostras e avaliação dos níveis de mediadores e mecanismos imunes antitumorais?

Os autores afirmam que mesmo com alguns estudos demonstrando aumento da resposta antitumoral, os dados que relacionam esses aspectos com atividade física e câncer, ainda necessitam de maiores esclarecimentos.

Portanto, torna-se importante pesquisar como as células do sistema imune se comportam nos órgãos linfóides e no sangue de camundongos sedentários induzidos a câncer de pulmão por Uretana. Essa compreensão aponta possibilidades para novos estudos acadêmicos, já que não existe consenso se o exercício físico pode contribuir para o aumento da porcentagem de células da resposta imune e se há benefício para o paciente no sentido de menor desenvolvimento tumoral.

Ainda que a aplicação laboratorial do presente estudo não entre na grande área de conhecimento da Educação Física, ele contribui para complementar minha formação como educador físico e amplia as possibilidades de desenvolvimento de

pesquisa em uma pós-graduação, onde o exercício seria introduzido na metodologia do trabalho científico. Relacionar o estudo em modelos sedentários é importante para formação do educador físico, para compreender o sedentarismo e como ele relaciona-se com o tumor, com o número de linfócitos e células mielóides supressoras. Além disso, não existe estudo em literatura até o momento onde as células mielóides supressoras tenham sido avaliadas em situações de treinamento físico e comparadas a condição de sedentarismo.

Embora a ciência tenha evoluído no tratamento de diversos tipos de câncer, a mortalidade por essa doença atinge muitas pessoas e é causa de sofrimento e dor para os pacientes e familiares. Todos nós perdemos já pessoas queridas devido ao câncer, portanto pesquisas que ajudem a entender ou combater essa epidemia são importantes na medida em que a superação dessa doença trará conforto não apenas ao paciente, mas a todos familiares e amigos.

Estudar o câncer através da Imunologia está sendo uma grande experiência pessoal. Aprender e aprimorar os conhecimentos laboratoriais no meio da pesquisa acadêmica, sempre foi um objetivo pessoal. Pessoalmente, participar de certa forma dos avanços nas pesquisas contra o câncer é algo motivador e que pretendo continuar fazendo.

Levando em conta o referencial bibliográfico acima, nosso grupo levantou o seguinte problema que foi pesquisado: Investigar se o desenvolvimento tumoral influencia a porcentagem de células da resposta imune e de células mielóides supressoras (MDSC) em tecidos linfoides de camundongos sedentários com câncer de pulmão induzido por Uretana.

Logo, nosso grupo teve o objetivo (geral) de investigar se ocorreu alteração na porcentagem de linfócitos e de células mielóides supressoras em tecidos linfoides de camundongos sedentários com câncer de pulmão induzido por Uretana. Mais especificamente, nosso grupo teve o objetivo (específico) de avaliar: (a) a área e o número de nódulos pulmonares; (b) a porcentagem da população de células mielóides supressoras no timo, pulmão, baço, medula óssea e sangue; (c) a porcentagem de linfócitos no timo, baço, pulmão, medula óssea e sangue em camundongos sedentários com câncer de pulmão induzido por Uretana.

Levantou-se a hipótese de que as células mielóides supressoras estariam significativamente mais expressas, enquanto os linfócitos estariam em número reduzido

nos tecidos avaliados dos camundongos sedentários com o câncer de pulmão induzido por Uretana. Em adição seria esperado um maior número de nódulos e área tumoral em animais induzidos com Uretana do que em animais saudáveis sedentários.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Animais e delineamento experimental:

Foram utilizados 12 camundongos machos BALB/c (criados no CEDEME-UNIFESP). Os animais tinham cerca de oito a 10 semanas de vida (20 - 25 gramas), foram colocados em micro-isoladores (ALESCO), e cuidados segundo as diretrizes dos Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (NIH publicação 86-23, revisada 1985) e seguindo os regulamentos do Comitê Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA). Os camundongos foram mantidos em uma sala isolada (somente para camundongos), sob as condições de: ciclo claro/escuro 12:12h, onde iluminação iniciava-se as 7h, e a temperatura era controlada com ar-refrigerado (22 ± 2 °C), com água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética UNIFESP N° 0117/09.

Os camundongos BALB/c constituem uma linhagem que frente a injeção de Uretana desenvolve 2 a 3 nódulos pulmonares (intermediariamente resistente) enquanto os camundongos A/J (suscetíveis) podem desenvolver de 5 a mais nódulos e os camundongos C57BL/6 se mostram resistentes, ou seja, não desenvolvem nódulos (MALKINSON e BEER, 1983).

1.2 Grupos:

Os 12 animais foram divididos em grupo controle (6 animais) e grupo carcinógeno (6 animais). A substância Uretana (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) foi dissolvida em 0.9% NaCl e injetada intraperitonealmente em duas doses (1,5g/kg cada dose) com intervalo de 48 horas (ROSIN *et al.*, 2011) nos animais do grupo carcinógeno.

1.3 Pesagem dos animais:

O peso dos animais foi acompanhado semanalmente para avaliar se o câncer de pulmão induzido por Uretana tem efeito sobre a massa corporal dos camundongos do grupo Uretana em relação ao grupo controle. A balança Shimadzu – Balança de

Precisão BL3200H e um becker foram para pesar os animais, tudo isso dentro do Fluxo Laminar (ESCO – *Laminar Flow Cabinet*) para manter a esterilidade dos camundongos.

1.4 Eutanásia:

Após 120 dias de segmento os animais foram eutanasiados através de anestesia de Xilazina (Agribbrands, Brasil) e Ketamina (Vetbrands, Brasil), diluídos em 10 ml de PBS (phosphate buffered solution-OXOID LTD Hampshire, Inglaterra) estéril. O abdômen e o tórax foram abertos para a coleta do baço, pulmão, timo, medula óssea e sangue.

1.5 Análise histológica:

Os pulmões foram fixados em formalina e em seguida embebidos em parafina. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (H&E), sendo posteriormente analisados por patologista. As lâminas foram utilizadas para mensurar no pulmão o número de nódulos e a área dos mesmos nos diferentes grupos de camundongos. O programa utilizado para mensurar as áreas dos nódulos foi o UHTSCSA Image Tool 3.0.

1.6 Contagem de linfócitos e citometria de fluxo:

As suspensões de células do baço, pulmão, medula óssea e timo foram obtidas pela maceração em peneira de 400µm. As células foram colocadas em tubos Falcon (15ml) e submetidas a 1 minuto de tampão de lise para causar hemólise. Após a lise esse volume foi suspenso com PBS para lavar as células. Na sequência as células foram centrifugadas e o volume ajustado para a contagem de viabilidade celular (Trypan blue) em câmara de Neubauer.

As amostras de sangue dos camundongos foram diluídas em PBS (1:1) e Ficoll-Hypaque (SIGMA; Saint Louis, Missouri) foi adicionado para que através da diferença de densidade entre os compostos seja possível, após centrifugação, separar o “anel” de leucócitos. Depois de preparado conforme descrito acima, o sangue foi centrifugado por 30 min a 1200 RPM a temperatura ambiente. O “anel” de células

coletado foi diluído em PBS para a remoção do Ficoll e as células foram novamente centrifugadas por 5 min a 1500 RPM e na sequência o volume foi ajustado para a contagem celular.

Para os marcadores de superfície, 1×10^6 das células do baço, timo, medula óssea e sangue foram incubadas por 30 minutos com *rat anti-mouse* (BD Biosciences Pharmingen) CD4 PerCP, CD8 Pe, e CD11b APC, e GR-1 Pe (Immuno-Tools, Alemanha). As células foram lavadas em PBS e suspensas em PBS-BSA para análise por citometria de fluxo. As células (com exceção do pulmão) foram analisadas no FACSCanto (Cell Quest Pro Software) Citômetro celular (BD Biosciences). Seguindo os mesmos passos que o grupo de Rosin *et al.* (2011) realizaram em seu estudo. As células do pulmão foram analisadas no FACS Aria II, Citômetro de *sorting* celular (separação de células por subtipo).

2. RESULTADOS

Devido aos efeitos do câncer sobre a saúde do animal, esses foram observados durante os 120 dias. Os grupos (Controle e Carcinógeno Uretana) eram observados semanalmente para avaliar se os animais apresentavam alterações ou perda de peso excessiva.

Houve a morte de 3 animais no dia da segunda dose de Uretana. Foi transferido um animal do grupo Controle para o grupo Uretana. No segundo dia, após a segunda injeção de Uretana, outro animal foi a óbito. Após 5 semanas da injeção de Uretana, um outro animal morreu sendo que o mesmo apresentava diminuição de peso corpóreo sem recuperação quando comparado aos outros animais. Ainda dois animais tiveram que ser sacrificados (segundo as normas do COBEA) no grupo Controle devido a lesões cutâneas causadas por brigas.

Devido aos óbitos durante a fase de experimento, não foi possível estabelecer dados de estatística, uma vez que se é necessário três animais no mínimo para o cálculo. Portanto, após os 120 dias, apenas 2 animais do grupo Controle e 2 animais do grupo Uretana sofreram eutanásia para avaliação. Mesmo assim, os dados foram utilizados para traçar diferenças de porcentagem na concentração de células mielóides supressoras (nos tecidos do sangue, pulmão, medula óssea e o baço), e diferença de porcentagem na concentração de linfócitos (apenas no baço), entre o grupo Controle e o grupo Uretana. O timo foi excluído das análises, pois nesse tecido apenas seria possível fazer relação com os linfócitos, deixando de lado as MDSC. Também, durante a fase de treinamento, os números de células do timo contados na câmara de Neubauer foram inconsistentes.

Tabela 1. Sobrevida dos camundongos BALB/c (ver texto para maiores detalhes).

Período em relação á injeção - Uretana	Grupos	
	Controle (n)	Uretana (n)
Dia 0	6	6
Dia +3	6	3
Dia +4	5	4
Dia +7	5	3
Dia +40	4	2
Dia + 120	2	2

2.1 Pesagem dos animais:

O peso foi aferido (Figura 1) já que o câncer de pulmão está relacionado com sua diminuição em seres humanos e animais. Alguns sintomas do câncer de pulmão podem levar a perda de apetite, conseqüentemente a perda de peso. A falta de ar, assintomática ou sintomática devido à paralisia do diafragma é um dos sintomas que em conjunto a dificuldade de engolir (disfagia) pode influenciar o apetite. Além disso, a metástase está relacionada com perda de peso inexplicável e outros diversos sintomas agravantes. (JOHNSTON, 2001).

A massa corpórea dos animais foi medida semanalmente da terceira semana até a vigésima semana. Ao longo das semanas, após a indução foi observado que o grupo Uretana apresentou menor ganho de peso corpóreo do que os animais do grupo Controle, sugerindo que o desenvolvimento tumoral pode ter sido o responsável por essa diferença.

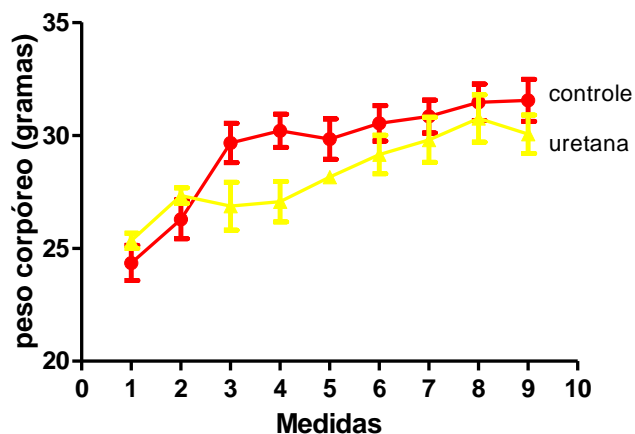


Figura 1. Representação do acompanhamento do peso dos camundongos. As medidas são referentes às datas das pesagens que são respectivamente: 23/05, 26/05, 15/06, 22/06, 27/06, 04/07, 11/07, 19/07 e 25/07. As medidas foram feitas do período das 14h-16h30.

2.2 Análises histológicas:

Os pulmões dos animais do grupo Uretana apresentaram 3 e 7 (animal 1 e 2, respectivamente) nódulos com área aproximada de 0,029 a 0.55 mm² (tabela 2), também observou-se hiperplasia nos pulmões do grupo Uretana.

Tabela 2. Incidência de lesão (nódulos) e área dos mesmos nos pulmões de camundongos BALB/c, após 120 dias.

Grupos	Incidência de lesão	Total de nódulos	Área total de nódulos (mm ²)
Controle	0 em 2 animais	0	0
Uretana	2/2	10	5,5/0,029-0,55

O número de nódulos do animal número 1 foi normal frente ao esperado da literatura (3 lesões contadas), mas o número de nódulos do animal número 2, foi acima do esperado (7 lesões), porém esse animal apresentava massa corporal similar ao camundongo número 1. Não foram encontradas lesões nos pulmões dos animais controles e a área de hiperplasia não foi mensurada.

A figura 2A demonstra um corte histológico representativo do pulmão de um animal injetado com Uretana evidenciando microscopicamente o nódulo pulmonar. Na figura 2B é possível identificar macroscopicamente os nódulos pulmonares.

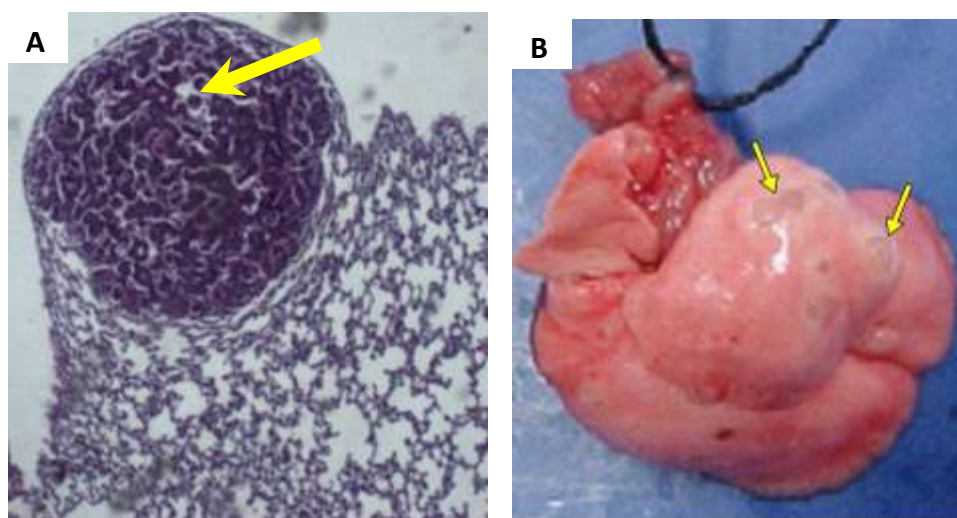


Figura 2: Corte histológico (x40) representativo do pulmão de um camundongo injetado com Uretana e sacrificado após 120 dias (A). Nódulos pulmonares em vista macroscópica do pulmão de um camundongo submetido à administração de Uretana e sacrificado após 120 dias (B). Setas indicam os nódulos tumorais

2.3 Contagem de células e citometria de fluxo:

Segundo Rosin *et al.* (2011), durante o desenvolvimento tumoral as células efectoras do sistema imune tem papel importante contra o câncer. No entanto, essas células podem ser inibidas por outras células, como as células T reguladoras e células

mielóides supressoras (MDSC). Assim, o próximo passo da pesquisa foi avaliar a porcentagem da MDSC em animais saudáveis sedentários com animais com câncer, também sedentários no baço, no pulmão, no sangue e na medula óssea. Também foram comparadas as porcentagens de linfócitos T CD4 e CD8 nos baços dos camundongos. A figura 3 mostra um exemplo de identificação das MDSC através de citometria de fluxo no pulmão. Em todos os tecidos essa população celular (MDSC) foi identificada e quantificada da mesma forma.

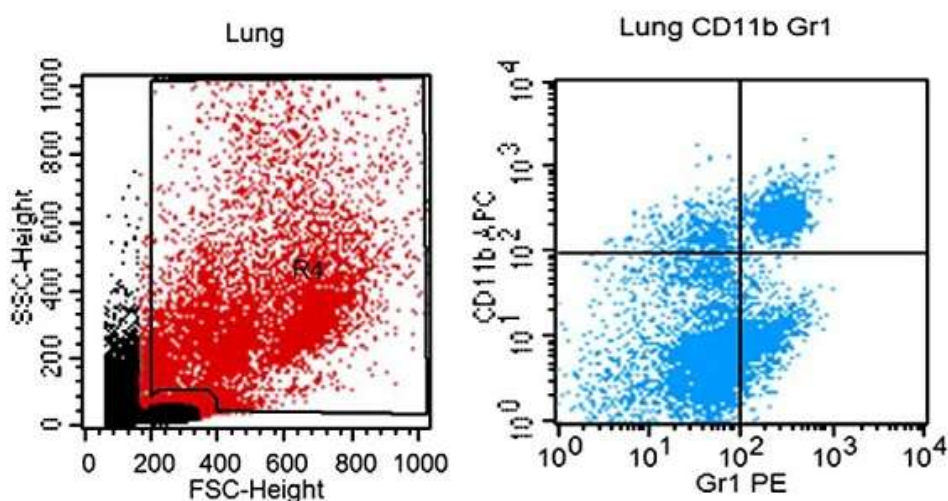


Figura 3. Representação das células pulmonares de um camundongo injetado com Uretana e observado após 120 dias. À direita são mostradas todas as células pulmonares com a delimitação da área de leucócitos (vermelho) para posterior identificação das MDSC, e à esquerda as células CD11b+Gr1+ são identificadas no quadrante superior direito.

Na tabela 3 e na figura 4 é possível observar que houve diferença entre a média de MDSC nos grupos Controle/C e Uretana/U no baço (C= 19,45%; U=10,95%), sangue (C=50%; U=62%) e medula óssea (C=69,95%; U=66,55). No sangue foi possível encontrar uma maior porcentagem de MDSC no grupo Uretana o que se observa também no sangue de pacientes com câncer, sendo esse marcador utilizado atualmente como prognóstico de evolução.

Mesmo usando apenas a porcentagem (impossibilitando identificar *p*), foi possível identificar uma concentração no sangue 12% maior de MDSC no grupo Uretana, em relação ao grupo Controle. Ao contrário do que se observou no baço, onde foi encontrada maior concentração de CD11b⁺Gr1⁺ no grupo Controle, do que no grupo Uretana.

Tabela 3. Média da porcentagem de MDSC entre os grupos GU e GC no *gate* de leucócitos nos diversos tecidos avaliados.

Células do Baço CD11b ⁺ Gr1 ⁺	Grupo Uretana (GU) 10,95%	Grupo Controle (GC) 19,45%
Células do Sangue CD11b ⁺ Gr1 ⁺	Grupo Uretana (GU) 62%	Grupo Controle (GC) 50%
Células da Medula Óssea CD11b ⁺ Gr1 ⁺	Grupo Uretana (GU) 66,55%	Grupo Controle (GC) 69,95%

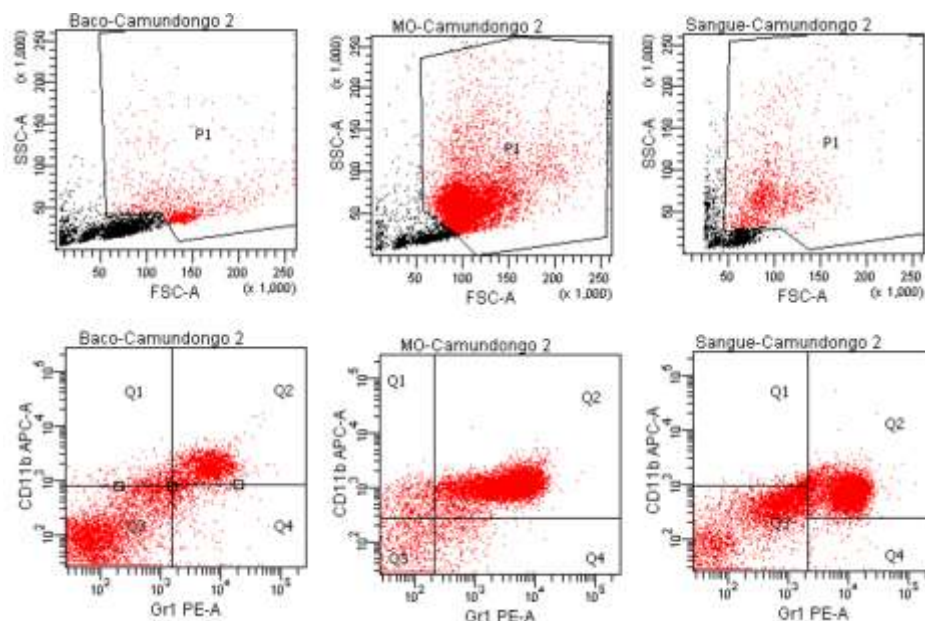


Figura 4. Análise representativa por citometria de fluxo (*dot plot*) para cada tecido analisado mostrando os leucócitos em *gate* (vermelho) e as MDSC (CD11+Gr-1+) no quadrante superior direito.

Observamos na tabela 4 que houve diferença entre a média de MDSC nos grupos Controle/C e Uretana/U no tecido pulmonar (C=2,5; U=8%). No pulmão observamos que a porcentagem de CD11b+Gr1+ do grupo Uretana, em relação ao grupo Controle, foi maior, confirmando assim nossa hipótese. O *dot plot* do pulmão está representado junto à tabela 4, que contém os resultados do tecido em porcentagem.

Tabela 4. Média da porcentagem de MDSC entre os grupos GU e GC no *gate* de leucócitos no pulmão.

Pulmão CD11b ⁺ Gr1 ⁺	Grupo Uretana (GU) 8%	Grupo Controle (GC) 2,5%
--	---------------------------------	------------------------------------

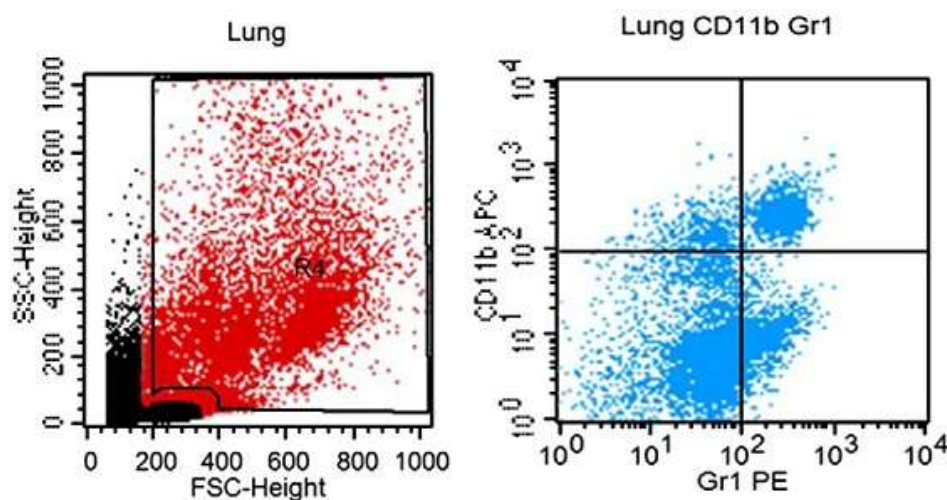


Figura 5. *Dot plot* do pulmão: a esquerda células totais do pulmão e o *gate* na região dos leucócitos (vermelho), à direita células mielóides supressoras no quadrante superior direito.

Os dados da Tabela 3 (baço, sangue, e medula óssea) e Tabela 4 (pulmão) estão representados na figura 6.

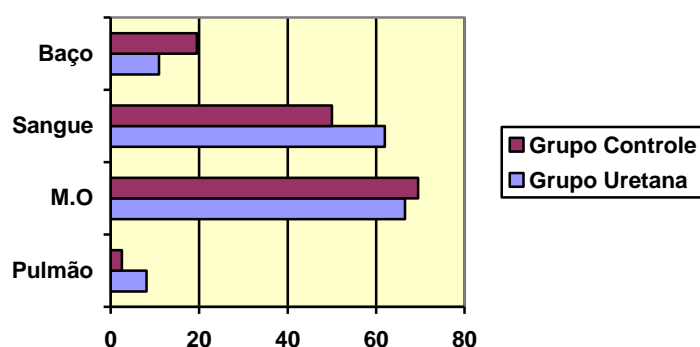


Figura 6. Média da porcentagem de MDSC no *gate* de leucócitos para os grupo Controle e Uretana nos tecidos analisados

Na tabela 5 e na figura 7 é possível observar que a porcentagem de linfócitos TCD4⁺ foi menor no grupo Uretana. Isso pode ser justificado já que durante o desenvolvimento do câncer, as MDSC podem causar supressão tanto pela diminuição do número quanto da função das células da resposta imune. Por outro lado, observamos maior porcentagem de células TCD8⁺ no baço de camundongos injetados com Uretana. Como as células CD8 são as principais responsáveis pelo combate ao tumor, podemos supor que tais células permaneçam em maior quantidade mesmo durante o desenvolvimento tumoral.

Tabela 5. Média em porcentagem de CD3+CD4+ e CD3+CD8+ no gate de linfócitos entre os grupos GU e GC.

Células do Baço	Grupo Uretana (GU)	Grupo Controle (GC)
TCD3 ⁺ CD4 ⁺	29,5%	33%
TCD3 ⁺ CD8 ⁺	13%	11,5%

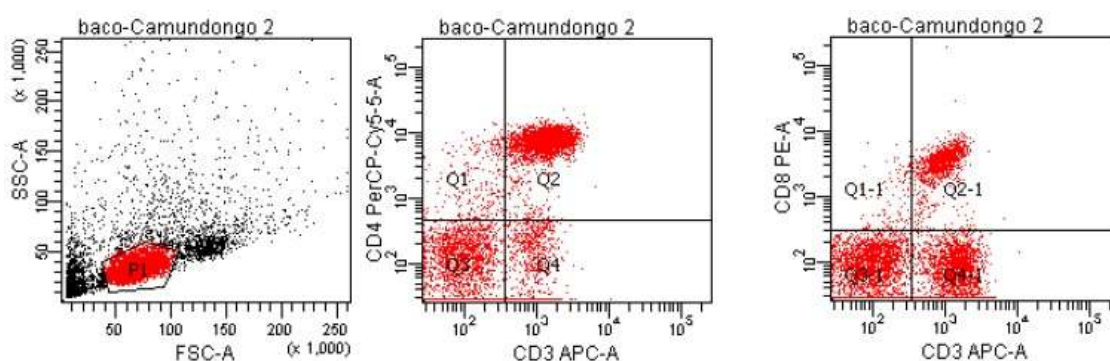


Figura 7. Análise representativa de citometria de fluxo mostrando as células totais e o gate nos linfócitos (vermelho) seguido pelas células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ no quadrante superior direito.

A contagem da viabilidade celular mostrou um maior número de células no sangue dos camundongos injetados com Uretana (tabela 6). Esse achado associado a maior porcentagem de MDSC (CD11b+ Gr-1+) no sangue (tabela 3) confirma que a coleta desse tecido (método menos invasivo) pode ser utilizada para a avaliação do desenvolvimento tumoral em pacientes.

Tabela 6. Quantificação da viabilidade celular nos diversos tecidos

Baço	Grupo Uretana (GU)	Grupo Controle (GC)
Número de células baço (x10 ⁶)	37	33
Medula Óssea	Grupo Uretana (GU)	Grupo Controle (GC)
Número de células na medula óssea (x10 ⁶)	10,8	10,2
Sangue	Grupo Uretana (GU)	Grupo Controle (GC)
Número de células no sangue (x10 ⁶)	7,8	4,7

3. DISCUSSÃO

De acordo com relatos de outros autores, observamos no presente estudo a toxicidade da Uretana, pois dos 7 camundongos injetados inicialmente, apenas 2 permaneceram vivos até o final do segmento (120 dias). Além disso, o carcinógeno também causou alterações na massa corpórea dos camundongos. Quando comparados os pesos dos animais injetados com Uretana nas primeiras semanas, pode-se identificar um possível caso de disfagia, que pode ter ocasionado perda de apetite e levando a perda de peso e dificuldade de ganhar peso. Segundo McCreery e John Costello (2013), a anorexia e a perda de peso estão presentes em 80% dos casos de câncer e é responsável por 20% das mortes. Um dos animais do grupo Uretana veio a óbito, após semanas da indução, ele apresentava dificuldade em ganhar peso e possivelmente estava entrando, ou já havia entrado num quadro de caquexia. Entretanto não foi possível constatar o quadro de caquexia, pois seria necessário o acompanhamento da ingestão de água e ração dos animais e verificar marcadores celulares.

Conforme o passar das semanas e a evolução do câncer, os camundongos do grupo Uretana, chegaram a um peso mais próximo do grupo Controle. Segundo Johnston (2001), esse fenômeno, possivelmente, aconteceu porque o câncer de pulmão acomete a condição de consumo de oxigênio, gera fadiga precoce e outros sintomas que, talvez, tenha levado os animais a um comportamento com menos movimentação e por isso tenha se aproximado ao peso dos animais controles. Essa hipótese poderia ser confirmada através do acompanhamento da ingestão de água, produção de excretas, característica das fezes, temperatura corporal, circunferência abdominal e movimento-levantar dos camundongos. Falkowski *et al.* (2011), alegou que esses parâmetros quantitativos são fáceis de ser acompanhados e que complementam parâmetros qualitativos, como: observação dos aspectos do pelo, aspecto das fezes, cor das patas e cauda, isolamento. Esses parâmetros poderiam determinar se os animais do grupo Uretana estivessem mais debilitados e com menos movimentação, logo, acreditamos que essa condição levou massa corporal similar ao grupo Controle no final das 20 semanas. Cabe também salientar que alterações na nutrição (desnutrição) causam mudanças na resposta imune o que pode favorecer o desenvolvimento tumoral (CHANDRA *et al.*, 1997; MCCREERY e COSTELLO, 2013).

Em confirmação a dados obtidos por outros autores (ROSIN *et al.*, 2011; PACELI *et al.*, 2012; KARABELA *et al.*, 2011), o presente estudo demonstra que a administração do carcinógeno Uretana em camundongos BALB/c sedentários leva ao desenvolvimento de nódulos tumorais. Os resultados obtidos na análise histológica e contagem de nódulos (tabela 1) mostram que todos os animais que receberam as injeções de Uretana desenvolveram nódulos (ROSIN *et al.*, 2011; SALINAS *et al.*, 2009; SALINAS *et al.*, 2009). A discriminação quanto aos subtipos histológicos (papilífero, sólido ou misto) não foi inserida no presente trabalho, mas segundo os dados de Cal (2012) a administração de Uretana em 24 camundongos BALB/c sedentários levou a formação de 18 nódulos papilíferos, 7 misto, e 27 sólido. Essa classificação identifica o grau de agressividade do tumor e pode ser utilizada para comparação aos dados da citometria de fluxo (relação entre subtipo histológico, com as concentrações de MDSC nos tecidos).

Em associação ao desenvolvimento de nódulos tumorais, encontramos no grupo Carcinógeno (Uretana) o aumento de células mielóides supressoras (MDSC) no sangue e pulmão em relação ao grupo Controle (sedentários saudáveis). Lembrando o que já foi mostrado na literatura (GOULART, PLUHAR e OHLFEST, 2012; RODRIGUEZ e OCHOA, 2008; YOUN e GABRILOVICH, 2010), as MDSC pode inibir a função das células T através da produção de fatores solúveis como as arginase-1, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e TGF- β .

Srivastava *et al.* (2012) observaram o aumento da porcentagem de MDSC no baço (2,6 – 4 vezes), no sangue (2 – 4) e na medula óssea (1.5 – 2) de camundongos injetados com células de carcinoma de pulmão Lewis (LLC) em relação a camundongos *naïves* enquanto nossos resultados demonstraram essa diferença apenas no sangue e no pulmão. Uma possível explicação é que os autores citados utilizaram um tipo de tumor diferente, do tipo carcinoma epidermóide de pulmão, enquanto o câncer de pulmão induzido por Uretana é do tipo adenocarcinoma. Entretanto, Rosin *et al.* (2011) utilizando o mesmo tipo de tumor que o presente trabalho demonstrou que a expressão de CD11b⁺Gr1⁺ (no baço) em 20 dias e 30 dias depois de injeção de Uretana foi similar ao grupo controle e que 120 dias após, o aumento foi discreto.

Outra explicação para as concentrações de CD11b⁺Gr1⁺, é que os animais já estavam com uma idade avançada (cerca de 7-8 meses de vida), e isso poderia influenciar a proliferação de células T CD4 e CD8. Ao mesmo tempo, já foi

demonstrado, na literatura, o aumento das MDSC no sangue de seres humanos idosos (67-99 anos) sem câncer (VERSCHOOR *et al.*, 2013). Outros tipos de câncer como o LCC, Carcinoma mamário 7000 4T1, e melanoma, por exemplo, tem o período menor de acompanhamento desde a injeção do carcinógeno até o desenvolvimento tumoral (o tumor se desenvolve mais rapidamente), o que pode interferir com a porcentagem de MDSC. Então a imunossenescência poderia estar relacionada com os dados do presente estudo. Mazzola *et al.* (2012), relata que no EUA a maioria de casos de câncer está ligado a idade, e 50% de cânceres malignos acomete pessoas de 65-95 anos. O mesmo grupo relata que a idade interage com as concentrações de células T. O processo está relacionado com a involução do timo, mudança no número, distribuição, e atividade de linfócitos T e B, redução de T CD4 e CD8 *naive*.

A concentração de células T (CD4 e CD8) nos dois grupos foi similar (tabela 3). Esse resultado foi contra nossas hipóteses, pois esperávamos encontrar maior concentração de linfócitos T CD3/CD4 e CD3/CD8 no grupo Controle do que no grupo Uretana. Esperávamos que nossos resultados corroborassem com Hanson *et al* (2010), que encontrou grande diferença na concentração das células T (no baço e no sangue) no grupo controle e baixa concentração no grupo câncer (carcinoma mamário). Ainda foi encontrado porcentagens significativas de CD11b⁺Gr1⁺ no sangue e no baço dos animais com câncer em relação aos animais saudáveis. Também no sangue, nós encontramos a maior diferença significativa em nossa análise, chegando a 12% a mais de CD11b⁺Gr1⁺ no grupo Uretana. Esse dado, mesmo que discreto, corrobora com Hudson *et al.* (2010) que obteve diferença de cerca de 75% CD11b⁺Gr1⁺ no grupo câncer murino (C57/BL6), quando comparado com o controle. Goulart, Pluhar e Ohlfest (2012), também analisaram o sangue (de cachorros) e constataram que apenas os animais com câncer muito evoluído (metástase) tinham maior porcentagem de CD11b⁺Gr1⁺ significativa.

Um resultado intrigante foi a porcentagem de células do baço, onde o grupo Controle teve maior concentração de CD11b⁺Gr1⁺. Esse resultado entra em conflito com a literatura (HANSON *et al*, 2010; ROSIN *et al.*, 2011; YOUN e GABRILOVICH, 2010; RODRIGUEZ e OCHOA, 2008; SRIVASTAVA *et al.*, 2012). Analisando os dados individuais da citometria, pode-se perceber que um animal do grupo câncer apresentou uma concentração muito baixa em relação ao outro animal. Levando em consideração que os camundongos utilizados em nosso modelo experimental são

idênticos (singênicos) e o experimento foi executado de forma igual para todos, acreditamos que possa ter ocorrido falha na técnica laboratorial, mas como temos apenas 2 animais em cada grupo não é possível confirmar essa hipótese. Além disso, como 1 animal desenvolveu apenas 3 nódulos enquanto o outro desenvolveu 7 podemos inferir a possibilidade de diferenças individuais mesmo em animais isogênicos. A diferença entre os grupos, em relação às concentrações de $CD11b^{+}Gr1^{+}$ no pulmão aproximam-se dos resultados significativos de Rosin *et al.* (2011) que identificaram essa concentração (8% no pulmão) 20 dias após a injeção de Uretana. Esses resultados podem levar a hipótese que o câncer induzido por Uretana mantenha constante a concentração de $CD11b^{+}Gr1^{+}$ infiltrantes no pulmão, diferentemente do LLC, que demonstrou em outros estudos, aumento mais significativo (39,4%) 21 dias pós indução tumoral (SRIVASTAVA *et al.*, 2012).

Nossos resultados abrem a discussão para desenvolvimento de estratégias que diminuam a presença (porcentagem) e consequentemente a atuação das MDSC propiciando assim o não desenvolvimento de lesões pulmonares (hiperplasia e nódulos). Srivastava *et al.* (2012) “depletaram” (removeram) as MDSC de camundongos induzidos a câncer pulmonar por injeção de células tumorais, através do tratamento com anticorpos específicos (Anti-Gr-1 e Anti-Ly6G) obtendo maior porcentagem e função das células do sistema imune (linfócitos T CD 8 e células NK).

Segundo os autores (SRIVASTAVA *et al.*, 2012), quando as MDSC são inibidas, há aumento das células apresentadoras de antígeno (APC), aumento da frequência e atividade das células NK e células T efetoras, favorecendo a resposta antitumoral e reduzindo o crescimento do tumor. Srivastava *et al.* (2012) constataram que houve aumento de 1.6–3 vezes na frequência das células NK, aumento de 1.5-3.3 de CD3, aumento de 1.5 de CD4 e aumento de 1.5-2 de CD8 nos grupos tratados (Anti-Ly6G e Anti-GR1) para remover as MDSC em relação ao grupo Controle (Isotipo). Ainda avaliaram os fatores antitumorais expressos pelas células NK (IFN γ [4–6 vezes], perforina [3–10 vezes] e granzima [2–4 vezes] mais) e CD8 (IFN γ [1,5–3 vezes], perforina [2–2,5 vezes], granzima [2,5–6 vezes] mais e reduziu expressão de IL-10 [2,4–3,6 vezes]). Essa informação torna-se pertinente a área da Educação Física, uma vez que o exercício físico moderado melhora a condição imunológica (WALSH *et al.*, 2011; PEDERSEN, ROHDE e OSTROWSKI, 1998), aumentando a expressão e a função das células citadas acima.

CONCLUSÃO:

Segundo os dados analisados no presente estudo, pode-se chegar a conclusão que a droga Uretana é tóxica e causa alterações de peso dos camundongos. Outros resultados nos demonstram que a injeção de Uretana pode levar os camundongos a óbito.

Nos animais sobreviventes, conclui-se, que a injeção de Uretana desencadeia o desenvolvimento de nódulos tumorais no pulmão. Esses nódulos estão associados ao aumento da concentração de células mielóides supressoras nos tecidos do sangue e do pulmão. Entretanto, nossos dados nos levam a crer que a quantidade de linfócitos T CD3+CD4+ e CD3+CD8+ no baço de animais com câncer induzido por Uretana, não tem diferença significativa em relação aos camundongos sedentários saudáveis. O número de células totais em cada tecido mostrou que o desenvolvimento do câncer induzido por Uretana, aumenta a o número de células contadas na câmara de *Neubauer*.

Nossos resultados demonstram que ainda são necessários maiores estudos em relação a uso de Uretana e a concentração de MDSC nos tecidos linfóides. Talvez, com um *n* maior e com outros grupos Uretana (20 dias e 30 dias, após a indução), o perfil da evolução do câncer nos tecidos estudados, seja mais bem compreendido.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1995.

BALTGALVIS, K.A. *et al.* The interaction of a high-fat diet and regular moderate intensity exercise on intestinal polyp development in Apc Min/+ mice. **Cancer prevention research, Philadelphia**, v.2, n.7, p.641-649, jan. 2009.

CAL, R.N. **Avaliação da influencia da atividade física aeróbica e anaeróbica na progressão do câncer de pulmão experimental**. 2012. 33f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências Correlatas) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, 2012.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. **American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v.66, p.460S-3S, ago. 1997.

CAMPUS OF VETERINARIAN, WASHINGTON STATE UNIVERSITY. **Working with Urethane**. 2005 Disponível em:
<<http://campusvet.wsu.edu/infoc/urethaneuse.htm#top>> Acesso em: 31/03/2012.

DIAZ-MONTERO, C.M. *et al.* Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. **Cancer, Immunology, Immunotherapy**. Charleston, v.58, n.1, p.49-59, jan. 2009.

FORBES C.D.; JACKSON W.F. **Atlas Colorido e Texto de Clínica Médica**. 2ª edição, São Paulo: Editora Manole Ltda., 1998.

FALKOWSKI, G.J.S. *et al.* Parâmetros para avaliação clínica de camundongos em experimentação. **Revista de Homeopatia**, Recife, v.74, n.3, p.93, 2011.

GRANGERA, C.L. *et al.* Exercise intervention to improve exercise capacity and health related quality of life for patients with Non-small cell lung cancer: A systematic review. **Lung cancer**, Amsterdam v.72(2), p.139-53, Mai. 2011.

GOULART, M.R.; PLUHAR, G.E.; OHLFEST, J.R. Identification of myeloid derived suppressor cells in dogs with naturally occurring cancer. **PLoS ONE**, Cambridge, v.7, n.3, mar. 2012.

HANSON, E.M. *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells Down-Regulate L-Selectin Expression on CD4+ and CD8+ T Cells. **Journal of immunology**, Baltimore, v.183, n.2, p.937–944, jul. 2009.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. **Estimativa 2012**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao/definicao>>. Acessado em 26/04/2012.

JOHNSTON, L. **Lung Cancer: Making Sense of Diagnosis, Treatment, and Options**. Sebastopol: O'Reilly Media / Patient Centered Guides, 2001.

JONES, L.W. *et al.* The lung cancer exercise training study: a randomized trial of aerobic training, resistance training, or both in postsurgical lung cancer patients: rationale and design. **BioMed Central cancer**, London, n. 21, p.10:155, abr. 2010.

KREISEL, D. *et al.*, Strain-Specific Variation in Murine Natural Killer Gene Complex Contributes to Differences in Immunosurveillance for Urethane-Induced Lung Cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v.72, n.17, p.4311-7, set. 2012.

KARABELA, S.P. *et al.*, Neutralization of Tumor Necrosis Factor Bioactivity Ameliorates Urethane-Induced Pulmonary Oncogenesis in Mice. **Neoplasia**, Ann Arbor, v.13, n.12, p. 1143-51, dez. 2011

KHAN, N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.293, n.28, p.133-143, jul. 2010

LANCASTER, G.I. *et al.* Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. **Exercise immunology review**, Champaign, v.10, p. 91-106, anual 2011.

LU, T. *et al.* Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.121, n.10, p. 4015-4029, out. 2011.

MACNEIL, B.; HOFFMAN-GOETZ, L. Chronic exercise enhances in vivo and in vitro cytotoxic mechanisms of natural immunity in mice. **Journal of applied physiology**. Bethesda, v.74, n.1, p. 388-395, jan. 1993.

MALKINSON, A.M.; BEER, D.S.; Major effect on susceptibility to urethan-induced pulmonary adenoma by a single gene in BALB/cBy mice. **Journal of the National Cancer Institute**. Bethesda, v.70, n.5, p. 931-936, maio 1983.

MALKINSON A.M. **Molecular comparison of human and mouse pulmonary adenocarcinomas**. Experimental lung research, New York, v.24, n.4, p.541-555, jul-ago. 1998. apud ROSIN, F.C.P.; PEDREGOSA, J.F.; ALMEIDA, J.S.de.; BUENO, V. **Identification of myeloid-derived suppressor cells and T regulatory cells in lung microenvironment after Urethane-induced lung tumor**. International Immunopharmacology, Amsterdam, v.11, n.7, p.870-875, jul. 2011.

MAZZOLA, *et al.* Aging, cancer, and cancer vaccines. **Immunity and ageing**, London, v. 9, n.1, p.4, abr, 2012.

MCCREERY, E.; COSTELLO, J. Providing nutritional support for patients with cancer cachexia. **International journal of palliative nursing**, London, v.19, n.1, p.32-7, jan. 2013

MEYERHARDT, J.A. *et al.* Impact of physical activity on cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer: findings from CALGB 89803. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**. New York, v.24, n.22, p. 3535-3541, ago. 2006.

PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. **Physiological reviews**, Bethesda, v.80, n. 3, 1055-1081, trim. 2000.

PEDERSEN, B.K.; ROHDE, T.; OSTROWSKI, K. Recovery of the immune system after exercise. **Acta physiologica Scandinavica**, Stockholm, v.162, n.3, p.325-32, mar. 1998.

PACELI, R.B. *et al.* The influence of physical activity in the progression of experimental lung cancer in mice. **Pathology, research and practice**, Stuttgart, v.208, n.7, p.377-81, jul. 2012

ROSIN, F.C.P. *et al.* Identification of myeloid-derived suppressor cells and T regulatory cells in lung microenvironment after Urethane-induced lung tumor. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v.11, n.7, p.870-875, jul. 2011.

RODRÍGUEZ, P.C.; OCHOA, A.C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. **Immunologic Revision**, Baltimore, v.222, p.180–191, abr. 2008.

RODRÍGUEZ, P.C. *et al.* Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses. **Cancer Research**, Baltimore v.64, p.5839-5849, ago. 2004

TOH, B. *et al.* Mesenchymal Transition and Dissemination of Cancer Cells Is Driven by Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrating the Primary Tumor. **PLoS biology**, San Francisco, v.9, n.9, set. 2011. Disponível em: <e1001162. doi:10.1371/ journal.pbio.1001162> Acesso em: 08/05/2012.

SRIVASTAVA, M.K. *et al.* Myeloid Suppressor Cell Depletion Augments Antitumor Activity in Lung Cancer. **PloS one**, San Francisco, v.7, n.7, jul. 2012.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Maple Shade, v.62, n.6, p.10-29, jan-fev. 2012.

SALINAS, N.R. *et al.* Lung tumor development in the presence of sphingosine 1-phosphate agonist FTY720. **Pathology & oncology research**, Budapest, v.15, n.4, p.549-54, dez. 2009

SALINAS, N.R. *et al.* FTY720 and lung tumor development. **International immunopharmacology**, Amsterdam, v.9, n.6, p.689-93, jul. 2009.


VERSCHOOR, C.P. *et al.* Blood CD33(+)HLA-DR(-) myeloid-derived suppressor cells are increased with age and a history of cancer. **Journal of leukocyte biology**, New York, v.1, Jan, 2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Cancer** 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em: 09/03/2012.

WALSH, N.P. *et al.* Position Statement Part one: Immune function and exercise. **Exercise immunology review**, Champaign, v.17, p.6-63, anual, 2011.

YOUN, J.I.; GABRILOVICH, D.I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. **European Journal Immunology**, Tampa, v. 40, n.11, p.2969–2975, fev, 2012.

ANEXOS

 <p>UNIFESP UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA</p>	<p>Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina</p>	<p>Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo</p>
--	--	---

São Paulo, 13 de fevereiro de 2009.
CEP 0117/09

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) VALQUIRIA BUENO
Co-Investigadores: Flavia Cristina Penilo Rosin, Camila Takao Lopes
Disciplina/Departamento: Nefrologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Avaliação do desenvolvimento de tumor pulmonar frente a nova droga imunossupressora FTY720**".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: EXPERIMENTAL - CATEGORIA C - ESTUDO CRONICO.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica - estudo experimental.

OBJETIVOS: Avaliar uma nova terapia FTY720 que pode ao mesmo tempo ser utilizada em transplante prevenindo o processo de rejeição além de impedir o desenvolvimento de tumores. Serão investigados os efeitos da administração do agonista da esfingosina-1 fosfato, o FTY720, no modelo experimental de câncer de pulmão induzido por uretana..

RESUMO: Serão utilizados camundongos Balb/C (55 animais) . O anestésico será xilazina e ketamina e a eutanásia será por overdose do anestésico. Os animais serão submetidos a indução tumoral pulmonar por injeção intraperitoneal de uretana, havendo intervalo de 48 horas entre a primeira e a segunda administração. O FTY720 será administrado por gavagem durante 5 dias consecutivos. Os animais serão mantidos em gaiolas comunitárias em um rack ventilado com sistema de filtragem de ar controlado no Biotério da disciplina de imunologia até o término do experimento..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Fundamentação apresentada.

MATERIAL E MÉTODO: Materiais e métodos adequadamente descritos.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Fapesp.

CRONOGRAMA: Adequado.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **08/02/10 e 08/02/11.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

1

117



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0117/09